



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/55, 9/16, 5/10, C07K 16/40, G01N 33/50, A61K 38/43, A01K 67/027		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/07855	
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	18. Februar 1999 (18.02.99)	
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98 05127		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, DE, EE, GE, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).		
(22) Internationales Anmeldedatum: 11. August 1998 (11.08.98)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>		
(30) Prioritätsdaten:				
197 34 764.9	11. August 1997 (11.08.97)			DE
197 58 501.9	15. Oktober 1997 (15.10.97)			DE
60 078,386	18. März 1998 (18.03.98)	US		
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MEM-OREC STOFFEL GMBH [DE DE]; Stöckheimer Weg 1, D-50829 Köln (DE).				
(72) Erfinder; und				
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STOFFEL, Wilhelm [DE DE]; Kornelimünsterstrasse 14, D-50933 Köln (DE); HOFMANN, Kay [DE DE]; Laboratorium für Molekulare Neurowissenschaften, Institut für Biochemie, Med. Fak., Joseph-Stelzmann-Strasse 52, D-50931 Köln (DE); TOMIUK, Stephan [DE DE]; Laboratorium für Molekulare Neurowissenschaften, Institut für Biochemie, Med. Fak., Joseph-Stelzmann-Strasse 52, D-50931 Köln (DE).				
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).				

(54) Title: **NEUTRAL SPHINGOMYELINASE**

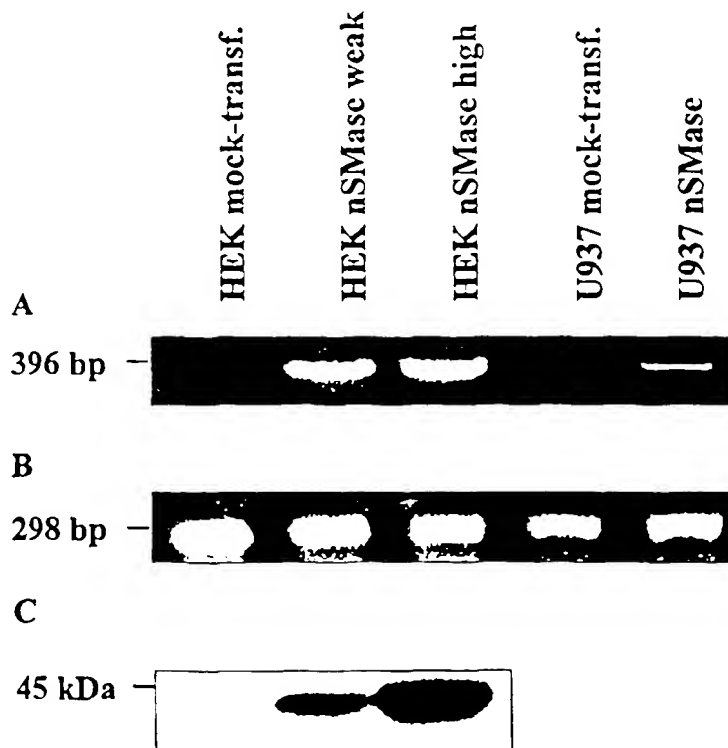
(54) Bezeichnung: **NEUTRALE SPHINGOMYELINASE**

(57) Abstract

The invention relates to eukaryotic neutral sphingomyelinase (nSMase) and the use thereof.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eukaryontische neutrale Sphingomyelinase (nSMase) und seine Anwendung.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Neutrale Sphingomyelinase

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase codieren, und ihre Anwendung.

Sphingomyelin ist eine wesentliche Komponente von Plasmamembranen. Der Abbau des Sphingomyelins gibt eine Vielzahl von Substanzen, die potentielle second messenger Eigenschaften haben, z.B. Ceramid, Sphingosin, Sphingosin-1-phosphat. Es sind zwei sphingomyelin-spaltende Enzymaktivitäten bekannt, zum einen die der lysosomalen sauren Sphingomyelinase und zum anderen die der plasmamembran-gebundenen neutralen Sphingomyelinase.

Die bakterielle neutrale Sphingomyelinase ist ein sezerniertes, lösliches Protein.

Durch die vorliegende Erfindung werden erstmals Nukleinsäuren, codierend für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase, verfügbar gemacht. Die eukaryontische neutrale Sphingomyelinase (nSMase) ist dadurch charakterisiert, daß sie Sphingomyelin in Ceramid und Phosphocholin spaltet und die Aktivität von der Zugabe von Magnesiumionen abhängig ist. Es handelt sich um ein membrangebundenes Enzym. Die maximale Aktivität wird im neutralen pH-Bereich erzielt.

Figur 1 zeigt die Gensequenz der humanen neutralen Sphingomyelinase.

Figur 2 zeigt die Gensequenz der murinen neutralen Sphingomyelinase.

Figur 3 zeigt die Ergebnisse von Northern- und Westernblots nSMase-überexprimierender Zelllinien.

Figur 4 zeigt die Strategie zur Erzeugung von murinen Knockout-Mutanten. Die Buchstaben symbolisieren Restriktionsschnittstellen.

Figur 5 zeigt Konstrukte zur Gewinnung transgener Mausmutanten.

Bevorzugt handelt es sich bei der erfindungsgemäßen Nukleinsäure um eine Nukleinsäure, die für die neutrale Sphingomyelinase eines Säugetiers codiert. In besonders bevorzugter Weise handelt es sich dabei um die humane und murine neutrale Sphingomyelinase. Die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen sind als Seq. ID. Nr. 3 und Seq. ID. Nr. 4 offenbart.

Teile der Nukleinsäuresequenzen stimmen mit der EST-Sequenzen AA028477 und AA013912 (murin) und W32352 und AA056024 (human) überein.

Bei Kenntnis der Aminosäure- und Nukleinsäurestruktur der humanen und murinen neutralen Sphingomyelinase kann der Fachmann unter Berücksichtigung der hohen Homologie zwischen der humanen und murinen nSMase die entsprechenden Nukleinsäuren und Proteine aus anderen Eukaryonten leicht auffinden. Dazu kann er zum einen kreuzreagierende Antikörper für eine spezifische affinitätschromatographische Aufreinigung einsetzen, oder er kann auf der Grundlage der Nukleinsäuresequenz Oligonukleotidprimer synthetisieren und die gesuchten Nukleinsäuren mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion in einer cDNA-Bank des Eukaryonten amplifizieren. Die entsprechende cDNA-Bank kann durch Isolierung von mRNA aus einer Gewebeprobe und anschließende Reverse-Transkription in an sich bekannter Weise erhalten werden. Aus der Nukleinsäuresequenz kann mit Hilfe des genetischen Codes die Aminosäuresequenz abgeleitet werden. Alternativ ist es hierzu auch möglich, homologe Sequenzen in EST (Expressed Sequence Tags)-Datenbanken zu suchen und zu kombinieren.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eignen sich zur Expression der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase in pro- oder eukaryontischen Systeme. Darüber hinaus sind sie auch zur Expression der nSMase in vivo im Sinne einer Gentherapie oder insbesondere in Form von Fragmenten auch in komplementärer Struktur als Antisense-Nukleotide zur Verringerung der Expression der nSMase geeignet.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können durch chemische Synthese oder durch Vervielfältigung in gentechnisch veränderten Organismen nach dem Fachmann an sich bekannten Verfahren hergestellt werden.

Gegenstand der Erfindung ist auch die durch die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren erhältliche eukaryontische neutrale Sphingomyelinase.

Die erfindungsgemäße nSMase läßt sich durch Expression in gentechnisch veränderten Organismen herstellen. Insbesondere sind eukaryontische Expressionssysteme geeignet. Entsprechende eukaryontische Expressionssysteme sind dem Fachmann bekannt wie beispielsweise pRc/CMV (Firma Stratagene). Die Aufreinigung aus gentechnisch veränderten Organismen bietet, insbesondere im Falle der Überexpression, einen leichten und direkten Zugang zur erfindungsgemäßen nSMase und erlaubt darüber hinaus die Isolierung in größeren Mengen.

Bevorzugt handelt es sich um die eukaryontische neutrale Sphingomyelinase eines Säugetiers, insbesondere um humane oder murine neutrale Sphingomyelinase. Die Aminosäuresequenzen der humanen und murinen neutralen Sphingomyelinase sind als Seq. ID. Nr. 1 und 2 wiedergegeben.

Die Molekulargewichte der humanen bzw. murinen Sphingomyelinase beträgt 47,6 bzw. 47,5 kDa. Im Gegensatz zu den bakteriellen nSMasen enthalten die erfindungsgemäßen nSMasen von Säugetieren keine Signalsequenz am N-Terminus. Aufgrund der Hydrophobizität

tätsanalyse kann davon ausgegangen werden, daß zwei benachbarte hydrophobe Membrandomänen am C-Terminus durch acht Aminosäuren getrennt sind. Es scheint sich daher um integrale Membranproteine zu handeln, deren katalytisch aktive Domäne zum Cytosol zeigt, während nur ein geringer Anteil der Enzyme Kontakt zur extrazellulären Umgebung hat. Dies ist im Gegensatz zu den bakteriellen nSMasen, bei denen es sich um sekretierte, lösliche Proteine handelt, ist aber in Übereinstimmung mit bisherigen Untersuchungen zu den Eigenschaften der neutralen Sphingomyelinasen von Säugetieren. Die 1,7 kb mRNA der murinen nSMase wird gemäß Northern Blot Analyse in allen Geweben exprimiert. In Nieren, Hirn, Leber, Herz und Lunge zeigt der Northern Blot ein starkes Signal, während die Expression in der Milz gering zu sein scheint. Diese Messung war nicht in Übereinstimmung mit den gemessenen enzymatischen Aktivitäten der entsprechenden Gewebe. Dies spricht für eine posttranskriptionale Regulation der nSMase.

Das pH-Optimum der erfindungsgemäßen neutralen Sphingomyelinase liegt im Bereich von 6,5 bis 7,5 mit einem K_m -Wert für C18 Sphingomyelin im Bereich von $1,0$ bis $1,5 \times 10^{-5}$ M. Die Aktivität ist magnesiumionenabhängig, die Zugabe von EDTA führt zu einer Inhibierung der SMase-Aktivität, kann jedoch durch Zugabe von Mn^{2+} - oder Mg^{2+} -Ionen wiederhergestellt werden. Die Zugabe von 0,3 bis 0,5% Triton X-100 erhöht die Enzymaktivität. Die Aktivität ist unbeeinflusst durch Behandlung mit DTT oder 2-Mercaptoethanol, wohingegen die Zugabe von 20 mM Glutathion zur Inhibierung führte. Die Aktivität der nSMase ist nicht auf Sphingomyelin limitiert, auch das strukturell verwandte Phosphatidylcholin wurde mit etwa 3% Aktivität gespalten.

Weiterhin beansprucht werden Varianten der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase. Unter den Begriff "Varianten" fallen sowohl natürlich vorkommende allelische Variationen der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase sowie durch rekombinante DNA-Technologie (insbesondere durch in vitro Mutagenese mit Hilfe von chemisch synthetisierten Oligonukleotiden) und an-

schließende Expression erzeugte Proteine, die hinsichtlich ihrer biologischen und/oder immunologischen Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase entsprechen. Dabei können sowohl Aminosäuren deletiert, eingefügt oder konservativ ausgetauscht werden. Konservativer Austausch bedeutet, daß eine Aminosäure durch eine Aminosäure ersetzt wird, die ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften aufweist.

So sind beispielsweise folgende Aminosäuren austauschbar: Serin für/gegen Alanin, Alanin für/gegen Glycin, Methionin für/gegen Serin, Lysin für/gegen Arginin, Lysin für/gegen Serin.

Insbesondere umfaßt der Begriff Varianten auch N- und/oder C-terminale verkürzte Proteine sowie acetylierte, glykosylierte, amidierte und/oder phosphorylierte Derivate.

Die Aktivität der nSMase scheint zumindest zum Teil im C-terminalen Bereich zu liegen, da das Fragment 1 bis 282 der murinen nSMase bei Expression in HEK293 Zellen keine Erhöhung der Sphingomyelinase-Aktivität zeigte. C-terminale Fragmente der nSMase sind ebenfalls Gegenstand dieser Erfindung. Auch Verbindungen, bei denen nSMase oder seine Varianten mit weiteren Molekülen wie Farbstoffe, Radionukliden oder Affinitätskomponenten gekoppelt sind, stellen erfindungsgemäße Varianten dar.

Beansprucht werden auch Nukleinsäuren, die für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase codieren bzw. komplementär zu diesen Nukleinsäuren sind. Bei den Nukleinsäuren kann es sich beispielsweise um DNA, RNA, PNA oder um nukleaseresistenter Analoga handeln. Nukleaseresistente Analoga sind insbesondere solche Verbindungen, in denen die Phosphodiesterbindung durch hydrolysestabile Verbindungen modifiziert sind, beispielsweise Phosphothioate, Methylphosphonate o.ä.

Für Antisensenukleotide sind insbesondere kurze Fragmente der Nukleinsäuren geeignet. Diese sollten aus Gründen der Spezifität bevorzugt mehr als 6, noch mehr bevorzugt mehr als 8 und am

meisten bevorzugt mehr als 12 Nukleotide aufweisen. Aus Gründen der Diffusion und der Kosten haben sie üblicherweise eine Länge von weniger als 30 Nukleotiden, bevorzugt 24 oder weniger und noch mehr bevorzugt 18 oder weniger Nukleotide.

Gegenstand der Erfindung sind auch Derivate von Nukleinsäuren, die für diagnostische oder therapeutische Zwecke mit anderen Molekülen gekoppelt sind, beispielsweise mit Fluoreszenzfarbstoffen, radioaktiven Markern oder Affinitätskomponenten, sowie Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und der zu diesen Nukleinsäuren komplementären Nukleinsäuren sowie Varianten der Nukleinsäuren.

Fragmente bezeichnet dabei Nukleinsäuren, die am 5' oder 3' oder an beiden Seiten verkürzt sind. Unter dem Begriff "Varianten" wird verstanden, daß diese Nukleinsäuren unter stringenten Bedingungen mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäure bzw. dazu komplementären Nukleinsäuren hybridisieren. Unter dem Begriff "stringente Bedingungen" wird verstanden, daß die Hybridisierung bei Bedingungen durchgeführt wird, bei der die Temperatur noch bis zu 10°C unter der Temperatur liegt (bei sonst identischen Bedingungen), bei der exakt komplementäre Nukleinsäuren gerade noch hybridisieren würden. Wenn beispielsweise eine exakt hybridisierende Nukleinsäure unter gegebenen Bedingungen bis zu einer Temperatur von ca. 55°C hybridisiert, dann sind stringente Bedingungen Temperaturen gleich oder höher 45°C. Bevorzugt ist der Temperaturbereich für stringente Bedingungen von 5°C, noch mehr bevorzugt von 3°C.

Desweiteren betrifft die Erfindung Antikörper, die gegen die erfindungsgemäße nSMase oder die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren gerichtet sind. Diese Substanzen eignen sich insbesondere zum Einsatz in der Diagnostik, dem Fachmann an sich bekannten Immunoassays, zur histologischen Untersuchung sowie als Arzneimittel zur Behandlung von Zuständen, die mit einer Überexpression der nSMase verbunden sind. Solche erfindungsgemäßen Antikörper können mit dem Fachmann an sich bekannten Verfahren durch

Immunisierung mit nSMase, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder Peptid- und Nukleinsäurenfragmenten in Gegenwart von Hilfsreagenzien erhalten werden.

Weiterhin sind Gegenstand der Erfindung Zelllinien, die die erfindungsgemäße nSMase überexprimieren. Solche Zelllinien sind erhältlich durch Transfektion mit Vektoren, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die für nSMase kodieren, enthalten. Im Falle von eukaryontischen Zelllinien kann die Transfektion beispielsweise durch Elektroporation erfolgen. Die Zelllinien sind dabei vorzugsweise stabiltransfiziert.

Überexpression bedeutet in diesem Zusammenhang, daß diese Zelllinie eine höhere Aktivität der nSMase aufweisen als die Zelllinien, die nicht mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren transfiziert wurden. Geeignete eukaryontische Zelllinien sind beispielsweise die Zelllinien U937, HEK 293 oder Jurkat.

Die Zelllinien zeigten in Experimenten eine spezifische nSMase-Aktivität zwischen 0,3 und 10 $\mu\text{mol/mg}$ Protein/Stunde.

Figur 3 zeigt die Northern und Western Blot Analyse der nSMase-Expression in transfizierten Zelllinien. Teil A zeigt dabei das Ergebnis einer RT-PCR der Gesamtzelle RNA mit Primern, die mit humaner und muriner nSMase cDNA hybridisieren. Teil B zeigt als Kontrolle die T-PCR der Gesamt-RNA mit Primern, die zu humanem β -Actin cDNA hybridisieren. Teil C zeigt den Westernblot des Plasma Membran Proteinextrakts von verschiedenen HEK 293 Zelllinien nach SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Hybridisierung mit dem polyklonalen Anti-nSMase-Antikörpern.

Die Zugabe von 0,5 mM Arachidonsäure führte zu einer dreifachen Erhöhung der nSMase-Aktivität in den überexprimierenden HEK-Zellen.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein transgenes Säugetier, das eine Überexpression (gain of function) oder eine Gendefi-

zienz bzw. einen Gendefekt (loss of function) für die erfindungsgemäße nSMase aufweist. Bevorzugt handelt es sich bei dem Säugetier um ein Nagetier, insbesondere eine Maus. Diese transgenen Säugetiere sind durch für den Fachmann an sich bekannte Verfahren erhältlich und eignen sich insbesondere zur Funktionsaufklärung der neutralen Sphingomyelinase. Für transgene Säugetiere werden definierte Genkonstrukte durch DNA-Mikroinjektion in den Vorkern (Pronukleus) einer befruchteten Eizelle im Einzellstadium injiziert, um die Expression des zusätzlichen Gens zu erreichen. Durch zielgerichtete Veränderung eines Gens im Genoms von ES-Zellen, die nachfolgend in Blastozysten injiziert werden, wird die Funktion eines Gens ausgeschaltet.

Die Strategie und Konstrukte zur Generierung der Mausmutanten sind in Figur 4 und 5 gezeigt.

Bevorzugt handelt es sich bei den transgenen Tieren um Tiere, bei denen das Gen zeitlich und gewebsspezifisch von außen induzierbar ein- bzw. ausgeschaltet werden kann. Entsprechende transgene Säugetiere eignen sich insbesondere zur Aufklärung der mit der erfindungsgemäßen nSMase im Zusammenhang stehenden Stoffwechsel- und Signaltransduktionswegen, die wiederum diagnostische oder therapeutische Anwendungen eröffnen. Insbesondere eignen sich die transgenen Säugetiere zum Screening von pharmazeutischen Wirkstoffen.

Die erfindungsgemäße eukaryontische neutrale Sphingomyelinase, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sowie die erfindungsgemäßen Antikörper können in Arzneimitteln und Diagnostikmitteln gegebenenfalls zusammen mit weiteren Hilfsstoffen enthalten sein. Diese Arznei- und Diagnostikmittel eignen sich zur Diagnose und Behandlung von Erkrankungen, die auf einer Über- oder Unterexpression und/oder einer erhöhten oder verminderten Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase und/oder auf Störungen der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und/oder Apoptose beruhen.

Insbesondere sind dies Erkrankungen, bei denen Entzündungsprozesse, Zellwachstumstörungen und Stoffwechselstörungen eine Rolle spielen. Dies können beispielsweise Krebserkrankungen oder Störungen der Cholesterinhomöostase (Arteriosklerose) sein.

Ein erfindungsgemäßes pharmazeutisches Screening-Verfahren beruht auf der Veränderung der Expression oder Aktivität der erfindungsgemäßen nSMase in nSMase-überexprimierenden Zelllinien bei Zugabe von mindestens einer potentiell pharmazeutisch wirksamen Substanz. Die Zelllinien eignen sich somit insbesondere zur Entwicklung und Prüfung von pharmazeutischen Leitstrukturen.

Die Erfindung soll durch die folgenden Beispiele weiter erläutert werden.

Beispiel 1

Klonierung der Nukleinsäure

Die erfindungsgemäßen für die neutrale Sphingomyelinase kodierenden Nukleinsäuren wurden in die NotI Schnittstellen der Klonierungsstelle des eukaryontischen Expressionsvektors pRc/CMV (Stratagene) kloniert. Die erhaltenen Sequenzen wurden durch Sequenzierung mit einem Perkin-Elmer DNA-Sequenzer 377A erhalten.

Beispiel 2

Klonierung der RNA

Die Gesamt-RNA wurde nach bekannten Methoden aus verschiedenen Organen von acht drei Wochen alten CD1 Mäusen isoliert und Poly(A')-RNA wurde durch Affinitätsreinigung an Oligo(dT)cellulose (Boehringer Mannheim Deutschland) gemäß Standardmethoden isoliert.

Beispiel 3

Überexprimierende Zelllinien

U937 Zellen wuchsen in RPMI 1640 Medium mit 10% fötalem Kälberserum, 1 $\mu\text{g/ml}$ Penicillin/Streptomycin und 0,03% Glutamin bei 37°C und 5% CO_2 . 5×10^6 -Zellen wurden mit 1 μg linearisierter Plasmid-DNA, die für die erfindungsgemäße nSMase kodierte durch Elektroporation mit einem "gene pulser" (Firma Bio-Rad) transfiziert. Die Selektion stabiler Klone erfolgte unter 1 mg/ml Geneticin (G418, Life Technologies, Gaithersburg, MD).

Die aus den Zelllinien aufgereinigte nSMase zeigte eine spezifische Aktivität zwischen 0,3 und 10 $\mu\text{mol/mg Protein/Stunde}$. Das pH-Optimum lag bei 6,5 und 7,5. Der K_m -Wert für C18 Sphingomyelin betrug 1,0 bis $1,5 \times 10^{-5}$ M. Die Aktivität war von der Anwesenheit von Magnesiumionen abhängig; die Zugabe von EDTA inhibierte die Aktivität.

Beispiel 4

Messung der nSMase-Aktivität

Die enzymatische Aktivität wurde in Zellen und Mäusegewebe untersucht. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und bei 1.000 g sedimentiert. Das Pellet wurde in Lysepuffer resuspendiert und die Zellen wurden durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen zerstört. Nach Zentrifugation für 2 min bei 2.500 g gefolgt von einer Extraktion mit Lysepuffer mit 0,2% Triton X-100. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 15 min bei 100.000 g.

Gewebe von drei Wochen alten Mäusen wurde in kaltem Lysepuffer homogenisiert. Die zu untersuchende Menge an Protein oder homogenisiertem Gewebe wurde mit 10 nm (80.000 dpm) $[\text{N-}^{14}\text{CH}_3]$ -Sphingomyelin für 30 min bei 37° in einem Gesamtvolumen von 200 μl inkubiert. Dann wurden 100 μl Wasser zugesetzt und unreaktiertes Substrat durch Extraktion mit Chloroform-Methanol (2:1, v/v) entfernt. Die Radioaktivität der wässrigen Phase, die

das enzymatisch freigesetzte Phosphocholin enthielt, wurde in einem Sintillationszähler gemessen.

Beispiel 5

Polyklonale Antikörper

Kaninchen wurden mit dem synthetischen Peptide CDPHSDKPFSDHE (entsprechend den Aminosäuren 261 bis 273 der murinen nSMase) gekoppelt an Keyhole-Limpit-Hemocyanin immunisiert. Das polyklonale Antikörperserum wurde durch Chromatographie an Hydroxyapatit und Affinitätschromatographie an einer Säule, an der das oben genannte synthetische Peptide gebunden war, gereinigt.

Patentansprüche

1. Nukleinsäure kodierend für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase.
2. Nukleinsäure gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sie für die neutrale Sphingomyelinase eines Säugetiers, insbesondere für humane oder murine neutrale Sphingomyelinase kodiert.
3. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die neutrale Sphingomyelinase Sphingomyelin in Ceramid und Phosphocholin spaltet und ihre Aktivität von der Zugabe von Magnesiumionen abhängig ist.
4. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 3 oder Seq. ID. Nr. 4.
5. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4 dadurch gekennzeichnet, daß es sich um DNA, RNA, PNA oder nukleaseresistente Analoga handelt.
6. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, daß es sich um mRNA, cDNA oder genomische DNA handelt.
7. Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie komplementär zur Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6 ist.
8. Eukaryontische neutrale Sphingomyelinase erhältlich durch Expression der Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 bis 6, insbesondere mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 1 oder Seq. ID. Nr. 2.

9. Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß sie gegen eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8 oder eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 gerichtet sind.
10. Zelllinie, dadurch gekennzeichnet, daß sie neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8 überexprimiert.
11. Zelllinie gemäß Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine eukaryontische neutrale Sphingomyelinase exprimierende Zelllinie handelt, die auf den Zelllinien U937, HEK 293 oder Jurkat beruht.
12. Transgenes Säugetier mit Überexpression (gain of function) oder Gendefizienz oder Gendefekt (loss of function) für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase.
13. Transgenes Säugetier gemäß Anspruch 12 dadurch gekennzeichnet, daß es ein Nagetier ist.
14. Arzneimittel enthaltend eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8, eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 und/oder einen Antikörper gemäß Anspruch 9 zusammen mit weiteren Hilfsstoffen.
15. Diagnostikmittel enthaltend eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8, eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 und/oder einen Antikörper gemäß Anspruch 9 zusammen mit weiteren Hilfsstoffen.
16. Verwendung der Arzneimittel gemäß Anspruch 14 oder der Diagnostikmittel gemäß Anspruch 15 zur Diagnose und Behandlung von Erkrankungen, die auf einer Über- oder Unterexpression und/oder einer erhöhten oder verminderten Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase und/oder

auf Störungen der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und/oder Apoptose beruhen.

17. Verwendung gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Erkrankungen um Entzündungsprozesse, Zellwachstumstörungen, Krebs und/oder Stoffwechselstörungen wie Störungen der Cholesterinhomöostase (Arteriosklerose) handelt.
18. Verfahren zum Screening von Wirkstoffen dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung der Expression oder Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase in Zelllinien gemäß Anspruch 10 bei Zugabe von mindestens einer möglichen pharmazeutisch wirksamen Substanz gemessen wird.
19. Verwendung der Zelllinie gemäß Anspruch 10 zur Entwicklung und Prüfung von pharmazeutischen Leitstrukturen.
20. Verfahren zur Herstellung der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8 durch chemische Peptidsynthese oder durch Expression in gentechnisch veränderten Organismen, insbesondere in eukaryontischen Expressionssystemen.
21. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 durch chemische Synthese oder durch Vervielfältigung in gentechnisch veränderten Organismen.
22. Nukleinsäuren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um das Gen für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase handelt und neben codierenden Bereich (Exons) nicht codierende Bereiche (Introns) aufweist, insbesondere ein Gen mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 5 und Seq. ID. Nr. 6.

23. Varianten der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8.
24. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um Derivate, Fragmente oder Varianten der Nukleinsäuren handelt.

human neutral Sphingomyelinase (NSM) Gene Sequence

ACCGCGGCCGTCGCTGGAGAGTTTCGAGCCGCTAGCGCCCTGGAGCTCCCCAACCATGA
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 TGGCGCCGGCAGCGACCTCTCAAGCTCGGCGGATCGCGGGGACCTCGAGGGGTTGGTACT
 E I
 AGCCCAACTTCTCCCTGCGACTGCGGATCTTCAACCTCAACTGCTGGTGAGTGCGTCTGC
 61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
 TCGGGTTGAAGAGGGACGCTGACGCCTAGAAGTTGGAGTTGACGACCACTCACGCAGACG
 GGAGTGCGGTCTGGGGGCCACCTTCCGTTGCGACCCATGCAGCCTTCCCTCCCCCTATCCC
 121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
 CCTCACGCCAGACCCCCGCTGGAAGGCAAGCGTGGGTACGTCGGAAGGAGGGGGATAGGG
 GCCCCACGATCTCAGGGGTGAGGGAAACCCGACCTCCAAAGTCCACATCTGGCCCCAG
 181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
 CGGGGTGCTAGAGTCCACATCCCTTTTGGGCTTGGAGGTTTCAGGTGTAGACCGGGGTC
 CGCCGGTGGTCCCGAGCTCCCTTCCCTGCCCCGCTTTCCTTCCCTTAGGGGCAATCC
 241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
 GCGGCCACCAAGGTCGTCAGCGAGGGGACGCGGCGAGAAGGGAAGGAATCCCCGTAAGG
 GTACTTGAGCAAGCACCGGGCCGACCGCATGAGCGCCTGGGAGACTTCTGAACCAGGA
 301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
 CATGAACCTCGTTCGTGGCCCGGCTGGCGTACTCGCGGACCTCTGAAAGACTTGGTCTT
 E II
 GAGCTTCGACCTGGCTTTGCTGGAGGAGGTGAGATTGTGCAGCACGGTGCGGAACCCAGG
 361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
 CTCGAAGCTGGACCGAAACGACCTCCTCCACTCTAACACGTCGTGCCACGCCTTGGGTCC
 CTGGGAGGAGGGACAGACCGTCCCCTGGGGAAAGACCAAGCAGGCATCCTCACCGCTTC
 421 -----+-----+-----+-----+-----+ 480
 GACCCCTCCTCCCTGTCTGGCAGGGTGACCCCTTCTGGTTCGTCCGTAGGAGTGGCGAAG
 CCTCAGGTGTGGAGTGAGCAGGACTTCCAGTACCTGAGACAGAAGCTGTACCTACCTAC
 481 -----+-----+-----+-----+-----+ 540
 GGAGTCCACACCTCACTCGTCTGAAGGTGATGGACTCTGTCTTCGACAGTGGATGGATG
 E III
 CCAGCTGCACACCACTTCCGGAGGTGAGAAGCCCACTGGCCTGAAGCCTGTTGTATCCC
 541 -----+-----+-----+-----+-----+ 600
 GGTGACGCTGTGGTGAAGGCCTCCACTCTTCGGGTGACCGGACTTCGGACAACAGTAGGG
 AGGAGGCTCTTGGCCCTGCCAGCCCTTCCCTATCCTGCCTGCACTCTCCAGTCTCCTCCA
 601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
 TCCTCCGAGAACCAGGACGGTCGGGAAGGGATAGGACGGACGTGAGAGGTGAGAGGAGGT
 GCCTCCTCTCCCTCTGGATGTGAGAGAAGGAGAAGGGTGAACCAAGAAGGTCTATGACT
 661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720
 CGGAGGAGAGGGAGACCTACACTCTCTTCCCTCTTCCCACTTGGTTCTTCCAGGATACTGA
 TCAGCCCATTTTCAGCTTTGTTTTCTGGCTGCCCTATACTCCTCCAAAGGCCGTGCGCTTG
 721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780
 AGTCGGGTAAAGTCGAACACAAAGACCGGATATGAGGAGGTTTCCGGCAGCGGAAC
 GTTCTAGGGCTAGTCCCAGCAGTAGAAAAAGAAAAAATAGCTGATCAGAGCTGGAAGAC
 781 -----+-----+-----+-----+-----+ 840
 CAAGATCCCGATCAGGGTCGTATCTTTTTCTTTTTTATCGACTAGTCTCGACCTTCTG
 AAGGGAGGGGAAGAAGGCTGGGTGTCTCTCCCTGTTTTTCTGGTTATTAAGCAGGGCTTG
 841 -----+-----+-----+-----+-----+ 900
 TTCCCTCCCTTCTTCCGACCCACAGAGGGACAAAAGACCAATATTCGTCCCGAAC

Figure 1-1

2 / 10

1861 GTCTCCCTCCTTCTCCGCGCATCTAGCATGAGGCAATGATTCCCTTAGGGCTCTGAGG 1920
 GAGAGGGGAGGAGAGGGGGTGTAGGATCTTACTCGSTTACTAAGGGGAATCCCGAGACTCC
 E VIII
 1921 AAGGCAACACAATGCTACCCCAAGAACTGNTACGTCCAGCCAGCAGGAGGTGAAGCCATTTC 1980
 TTCCGTTGTGTTACCATGCGTTCTTGACNATGCACSTCGGTCTCCTCGACTTCGGTAAAG
 1981 CCTTTGGTGTCCGCATTGACTACGTGCTTTACAAGGTCAAGGCTCCTCCCTTCAACATGCT 2040
 GGAAACCACAGGGGTAACTGATGCAGGAAATGTTTCAGTCCGAGGAGGGAASTGTACGA
 2041 TTCATATGCTGTGTCTCTTTGTCTACTAACCTGTGTAGATCTTTGCTCAGNTAGTCTAG 2100
 NAGTATACGACACAGAGAACACAGATGATTTGACACATCTAGGAACGAGTCTNATCAGATC
 2101 TTTTGGACCACTGATGGGTGGAAAGTGGGCTAGCCGCGAGCTGCTTCTCTGGGAAGAGGC 2160
 AGAACTGTGTGACTACCCACCTTTCACTCTCATGCGCTCTGACCAAGAGACCTTCTCCG
 2161 GTCATATATATAAGCTTCTCTGTTGGGCTTACTTTCTCTAGGCACTTTCTGGSTTTTACAT 2220
 CGAGTATATATTGAGAGAGAAATCGGCAATGAAAGATTTCTCTGAAAGACCCAAATGTA
 2221 GTCCCTGTAAAGSTTTTGAAGCACTACAGGCTTTGAGCTTACAGGGGSCAGCCCCCTCTC 2280
 GAGGACATTCTCAAAACTTTGCTGATGTCTGAACTGGGANTGTCCCCGTGGGGGGAGAG
 E IX
 2281 TTGATCATGAAGCCCTGATGGCTACTCTGTTTGTGAGGCACAGCCCCCAGCAGAAACC 2340
 AACTAGTACTTCGGGACTACCGATGAGACAAACACTCCGTGTCCGGGGGTGTCTCTTGG
 2341 CCAGCTCTACCCACGGTGAGTCACCCCCACTTTTCTTGGCCCTTGCCCCGCTTGAAGC 2400
 GGTGAGATGGGTGCCACTCAGTGGGGGTGGGAAAGGAACCGGAACGGGGCGAATTCTG
 2401 AGCCCTTCCACTCTTGAATCTCTCTGCCCCACTGCCCTGCTCTGTTGTAGGACCAGCAG 2460
 TCGGGAAGGTGAGAACTGAGAGAGGACGGGCTGACGGGACGAGACAACATCTGGTCTGTC
 2461 AGAGGTGCGCGTTGATGTGTGTGCTAAAGGAGGCTGGACGGAGCTGGGTCTGGGCATGG 2520
 TCTCCAGCGGCACTACACACACGATTTCTCTCGGACCTGCCTCGACCCAGACCCGTACC
 2521 CTCAGGCTCGCTGGTGGGCCACCTTCGCTAGCTATGTGATTGGCCTGGGGCTGCTTCTCC 2580
 GAGTCCGAGCGACCAACCCGCTGGAAGCGATCGATACACTAACCGGACCCCGACGAAGAGG
 E X
 2581 TGGCACTGCTGTGTGTCTCTGGCGSCTGGAGGAGGGGCCGGGAAGCTGCCATACTGCTCT 2640
 ACCGTGACGACACACAGGACCGCGACCTCTCCCCGGGCCCTTCGACGGTATGACGAGA
 2641 GGACCCCCAGTGTAGGGCTGGTGTGTGGSCAGSTGCATTCTACCTCTTCCACGTACAGG 2700
 CCTGGGGGTACATCCCGACCAACGACACCCGTCCAGTAAGATGGAGAAGGTGCATGTCC
 2701 AGGTCAATGGCTTATATAGGGCCAGGCTGAGCTCAGCATGTGCTAGGAAGGGCAAGGG 2760
 TCCAGTTACCGAATATATCCCGGCTCGAATCGAGGCTGTACAGATCCTTCCCGTTCCTC
 2761 AGGCGGAGGATCTGGGCGCAGAGGCTCAGCCAGCCCTACTCTGGGGCAGCAGGAGGGGG 2820
 TCCGGSTCTAGACCCGGGTCTCGAGTCTGTCGGGTGAGGACCCCGTCTCTCTCCCC
 ACAGAACTAAAGAACAAATAAAGCTTGGCCCA

3 / 12

2821 -----+-----+-----+-- 2852
TGTCTTGATTCTTGTTATTTGAACCGGGTT

Figur 1-3

[illegible]

Figure 2-1

5 / 12

cccaggcgctgggCTGCAGCCTCGGAGCCACCTTCCAGTCCCCTCTCGCACATGCCTAGGA
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
gggtccgcacccGACGTCGGAGCCTCGGTGGAAGGTCAGGGGAGAGCGGTGTACGGATCCT

AGGAAGCAGGTCTTCTTCAGCCGAGCTAGACCCCTGTCCTTCCCGAACCACCAAAGTCCAC
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
TCCTTCGTCCAGAAGAAGTCGGCTCGATCTGGGACAGGAAGGGCTTGGTGGTTTCAGGTG

ATCGCCTAAAGACCAGAGCTTGGGTGGTTGCAGCAATCACCAAAGTCCCTATCATCCAAA
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
TAGCGGATTTCTGGTCTCGAACCACCAACGTCGTTAGTGGTTTCAGGGATAGTAGGTTT

GCTGAGGTGATGACAGCAGTAATCGTCCCAAACCTGGCCCATGTCTTTCTTTTAAATGA
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
CGACTCCACTACTGTCGTCAATTAGCAGGGTTTGGACCGGGTACAGAAAGGAATTTACT

TTTACTTTTATTTTATGTACATTTGGTGTGTTTGCCTGTATGTATGTCTGTGTGAAGGTGC
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
AAATGAAAATAAAATACATGTAAACCACAAAACGGACATACATACAGACACACTTCCACG

CAGATTCTCTGGAACCTGGAGTTACAGACAGTTGTAAGCTGTCTGTGCTTGCTGGAAATT
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
GTCTAAGAGACCTTGACCTCAATGTCTGTCAACATTTCGACAGTACACGAACGACCTTTAA

GAACTGCTGACCCATCTCTTCTGCCCCCTGCGTCTCCACCCCTTTTAGGGACATCCCCT
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
CTTGACGACTGGGTAGAGAAGACGGGGGACGCAGGAGGTGGGGAAAATCCCTGTAGGGGA

ACCTGAGCAAACATAGGGCGGACCGCATGAAGCGCTTGGGAGACTTTCTGAACTTGAAAA
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
TGGACTCGTTTGTATCCCGCCTGGCGTACTTCGCGAACCCCTCTGAAAGACTTGAACCTTT

E II
ACTTTGATCTGGCTCTCCTGGAGGAGGTGAGGTTGTAGGGCAGGCTAGGTTGGAGGAGGG
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
TGAAACTAGACCGAGAGGACCTCCTCCACTCCAACATCCCGTCCGATCCAACCTCCTCCC

CAGCAGGCGGCAGGCGGCGGCAGGAAAACTTGTTCTGTCTTGGGATGAAATCCCAAGCAA
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
GTCGTCCGCCGTCCGCCCGCTCTTTTGAACAAGACAGAACCCTACTTTAGGGTTTCGTT

GTATCCTCACCTTCTTCTCCAGGTGTGGAGTGAGCAGGACTTCCCAGTACCTAAGGCAA
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
CATAGGAGTGGAAGAAGGAGGTCCACACCTCACTCGTCTGAAGGGTCATGGATTCCGTT

E III
AGGCTATCGCTCACCTATCCAGATGCACACTACTTCAGAAGGTGAAAAGCCTGTGTTCTC
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
TCCGATAGCGAGTGGATAGGTCTACGTGTGATGAAGTCTTCCACTTTTCGGACACAAGAG

AGCCTGTTCTCAGACGAGGAAGCTCTCCAACATTCTTGCTTGCAACCCTCGATCTTCTTCC
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
TCGGACAAGAGTCTGCTCCTTCGAGAGGTTGTAAGAACGAACGTGGGAGCTAGAAGAAG

TCTGGGTGTGAGAAGAGCAGGCCGTCACCCTCATCTTGCAAGGGCTGCTGTCTTAGGCTT
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
AGACCCACACTCTTCTCGTCCGGCAGTGGGAGTAGAACGTTCCCGACGACAGAATCCGAA

TGTTCTGGGGTTGATCTTAGCAGTAGAGCTGGGAGACCGCGGAGGGGAAGAGGGCTGGCT
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
ACAAGACCCCACTAGAAATCGTCACTCTCGACCCTCTGGCGCCTCCCCTTCTCCCGACCGA

Figur 2-2

6 / 10

E IV

1741 GGGTACTCCCTCCCTTGGTCTTCTGCTTATTAAAGCAAGAGATTGCTTTTTCAGCGGGGATGAT 1800
-----+-----+-----+-----+-----+
CCCATGAGGGGAGGAACGAGAAGACCAATAATTTCGTTCTCAACCAAAAGTCGCCCTACTA

1801 AGGCAGTGGCCCTCTGTGTGTTCTCCAAAACCCCAATCCAGGAAATCTTCCAGCATGTCTA 1860
-----+-----+-----+-----+-----+
TCCGTCAACCGGAGACACACAAGAGGTTTGTGGGTTAGGTCCCTTTAGAAGGTCGTACAGAT

1861 CAGTCTGAATGGTTACCCCTACATGCTAAGGATCTCTTCCCTATCCTTGCTAACACAGAC 1920
-----+-----+-----+-----+-----+
GTCAGACTTACCAATGGGGATGTACCATTCCCTASAGAAGGSATAGGAAGGATTGTGTCTG

1921 TGGACGAGCCCTTCTGSGGGCCCTTGCGAGGAGGGTCTCAGTACCCTGAGTTTTTGTCTTC 1980
-----+-----+-----+-----+-----+
ACCTGGCTCGGAAGGACCCCGGAACCGTCCCTCCACAGTCAATGGGACTCAGAAACAGAGAG

1981 TCTTGCCCTGCAGTTCCATCATGGAGACTGTTTCTGTGGGAAGTCTGTGGGGCTGCTGGTG 2040
-----+-----+-----+-----+-----+
AGAACGGAGCTCAAGGTAGTACCTCTGACCAAGACACCCCTTCAGACACCCCGACGACCAC

E V

2041 CTCCGTCTAAGTGGACTGGTGTCTCAATGCCTACGTGACTCATGTGATGGGGCTAGCCAG 2100
-----+-----+-----+-----+-----+
GAGGCAGATTACCTGACCAAGGAGTTACGGATGCCTGAGTACACTCAGCCCGATCGGTC

2101 GCTTAGGCAGTGGGTCAAGCAGCCCAATGCTATGGTGGAGAAGAGACGCCACTAGTTAGT 2160
-----+-----+-----+-----+-----+
CGAATCCGTCACCCAGTTCGTGGGTTACGATACCACCTCTTCTCTGGGGTATCAATCA

2161 TCTGCTCCCTGGGGATAAGGCAATGGGATCAGAAGCTAGCATTGGGCAAGGTTACCCATT 2220
-----+-----+-----+-----+-----+
AGACGACGGACCCCTATTCCGTACCCTAGTCTTCGATCGTAACCCGTTCCAAGTGGGTAA

2221 CCCTGTCACACTCTGCCATGTGACAGATGACAAGCTTGATTGAGACAGCCCTTCTCTTTGA 2280
-----+-----+-----+-----+-----+
GGGACAGTGTGAGACGGTACACTGTCTACTGTTGAACTAAGTCTGTGGAAGAGAACT

2281 TTTACCTATTCCACTTTAGCTACATGCTGAGTACAGCCGACAGAAGGACATCTACTTTG 2340
-----+-----+-----+-----+-----+
AAAGTGCATAAGGTGAAATCGATGTACGACTCATGTGGGCTGTCTTCTGTAGATGAAAC

E VI

2341 CACACCGTGTGGCCCAAGCTTGGGAACTGGCCCAAGTTCATCCAGTGTGTGAGCCTGGGCT 2400
-----+-----+-----+-----+-----+
GTGTGGCACACCGGTTTGAACCCCTTGACCGGGTCAAGTAGGTACACACTCGGACCCGA

2401 TGATGGGGGCTGTGGGGTGGGGACGGGGTTGAGGATGNGNAANTTATCCTTGAAGAGGG 2460
-----+-----+-----+-----+-----+
ACTACCCCGGACACCCCAACCCCTGCCCAACTCCCTACNCTTNAATAGGAACCTTCTCCC

2461 CACATAATAAGGGAAGAAATTCCTCCTTGCCGCTCTTCCCCCAACTCAGCCACACATCCA 2520
-----+-----+-----+-----+-----+
GTGTATTATTCCCTTCTTAAAGGAGGAACGGCGAGAAGGSGGTTGAGTCGGTGTGTAGGT

E VII

2521 AGAATGCAGATGTGTTCTATTGTGTGGAGACCTCAATATGCACCCCAAGACCTGGGCT 2580
-----+-----+-----+-----+-----+
TCTTACGTCTACACCAAGATAACACACCTCTGGAGTTATACGTGGGGTTTCTGGACCCGA

Figur 2-3

7 / 12

GCTGCCTGCTGAAAGAGTGGACAGGGCTCCATGATGCTTTCGTTGAGACTGAGGACTTTA
2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640
CGACGGACGACTTTCTCACCTGTCCCGAGGTACTACGAAAGCAACTCTGACTCCTGAAAT
AGGTGAGAGACTGTTTCCCACCAACTCCACACTTGTTCAGTCTTCCTGTCTCTTAGCAT
2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700
TCCACTCTCTGACAAAGGGTGGTTGAGGTGTGAACAAGGTGAGAAGGACAGAGAATCGTA
CCTAGCCACCTGTTTCCCTAGGGCTCTGATGATGGCTGTACCATGGTACCCAGAAGTGC
2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760
GGATCGGTGGACAAAGGGATCCCGAGACTACTACCGACATGGTACCATGGGTTCTTGACG

E VIII

TACGTCAGCCAGCAGGACCTGGGACCGTTTCCGTCTGGTATCCGGATTGATTACGTGCTT
2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820
ATGCAGTCGGTCGTCTGGACCCCTGGCAAAGGCAGACCATAGGCCCTAACTAATGCACGAA
TACAAGGTCAGGCTCTTATTTCCCGGTGTGCTTCTCCAGTATCTTCCTTCTCTGTACT
2821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880
ATGTTCCAGTCCGAGAATAAGGGCCACACGGAAGAGGTCTAGAAAGGAAGGAGACAGTGA
AGCCCAAGCTTTAGTTCAGCTACAGTCTTGGGCCACTGATGGCTAAAGAATAGAATCCTG
2881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2940
TCGGGTGCGAAATCAAGTCGATGTCAGAACCCGGTGACTACCGATTCTTATCTTAGGAC
TCGGCTGGTTCTCTGGGAGAAATTAAGCTTCTCCATGTTCTTGCTCTTCCTAGGCACTCT
2941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3000
AGCCGACCAAGAGACCCCTCTTAAATTCGAAGAGGTACAAGAACGAGAAGGATCCGTCAGA
CTGAGTTCCACGTCTGCTGTGAGACTCTGAAAACCACTACAGGCTGTGACCCTCACAGTG
3001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3060
GACTCAAGGTGCAGACGACACTCTGAGACTTTTGGTGATGTCCGACACTGGGAGTGTAC

E IX

ACAAGCCCTTCTCTGATCAGAGGCCCTCATGGCTACTTTGTATGTGAAGCACAGCCCCC
3061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3120
TGTTGCGGAAGAGACTAGTGCTCCGGGAGTACCGATGAAACATACACTTCGTGTGCGGGG
CTCAGGAAGACCCCTGACTGCCTGTGTAAGCAGCATTTCTTTGCCCCCTCTACTTTA
3121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3180
GAGTCCTTCTGGGGACATGACGGACACCATTTCGTCTGTAAGGAACGCGGGGAGATGAAAT
AGGCAGCCCCGCTCCATCCTGACCCTCCCTGCTCTACGTTCTCTCTTTTCCAGGCCC
3181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3240
TCCGTGCGGGCGGAGGTAGGACTGGGAGGGGACGAGATGCAAGAGAGAAAAAGGTCCGGG
ACTGGAAGGTCCGATTTGATCAGCGTGCTAAGGGAGGCCAGGACAGAGCTGGGGCTAGG
3241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3300
TGACCTTTCCAGGCTAAACTAGTCGCACGATTCCCTCCGGTCTCTGCTCGACCCCGATCC

E X

CATAGCTAAAGCTCGCTGGTGGGCTGCATTCTCTGGCTATGTGATCGTTTGGGGGCTGTC
3301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3360
GTATCGATTTTCGAGCGACCACCCGACGTAAGAGACCGATACACTAGCAAACCCCGACAG
CCTTCTGGTGTGCTGTGTGCTCTGGCTGCAGGAGAAGAGGCCAGGGAAGTGGCCATCAT
3361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3420
GGAAGACCACAACGACACACAGGACCGACGTCCTCTTCTCCGGTCCCTTCACCGGTAGTA

Figur 2-4

8 / 12

```

CCTCTGCATACCCAGTGTGGGTCTGGTGGTAGCAGGTGCAGTCTACCTCTTCCACAA
3421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3480
GGAGAGCGTATGGGTACACCCAGACCACGACCATCGTCCACGTCAGATGGAGAAGGTGTT

GCAGGAGGCCAAGGGCTTATGTGGGGCCAGGCTGAGATGCTGCACGTTCTGACAAGGGA
3481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3540
CGTCCTCCGGTTCCCGAATACAGCCCGGGTCCGACTCTACGACGTGCAAGACTGTTCCCTT

AACGGAGACCCAGGACCGAGGCTCAGAGCCTCACCTAGCCTACTGCTTGCAGCAGGAGGG
3541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3600
TTGCCTCTGGGTCTGGCTCCGAGTCTCGGAGTGGATCGGATGACGAACGTCGTCCTCCC
stop
GGACAGAGCCTTAAGAGCTTAACAATAAACTTGCTTGACACACTCTAGTGGCTCTACCTT
3601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3660
CCTGTCTCGAATTCTCGAATTGTTATTTTGAACGAACGTGTGTGAGATCACCGAGATGGAA

GTTCCCTTGCAGAGGCATGATGGGAAGTCAAGSTCASTGGCCTTGTCAGTGTGTGGCTTTA
3661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3720
CAAGGAACGTCTCCGTACTACCCCTTGACTTCCAGTCAACGGGAACAGTGACACACCGAAAT

GAGGGTTGGCTCTCACTTCCCTTTTTCGACACTCCCGTCTCCTGCCAGCACAGAGCAT
3721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3780
CTCCCAACCGGAGAGTGAACGGGAACACGTGTGAGGGCAGAGGACGGTCTGTCTCTCGTA

AAACCCCTGTTTCATGGTCAATAATCCTTTTATTGTAAACAACGAAGCCTCTGACTAAGCAGT
3781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3840
TTTGGGACAAGTACCAGTATTAGGAAAATAACATTTGTTGCTTCGGAGACTGATTCTGTCA

CCAGATGGCGGAGGTACAGCCCTTGTGATGGTGTCTTGCTTACGGGGCAGGGAGGCAGCT
3841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3900
GGTCTACCGCCTCCATGTCCGGGAACACTACCACAGAACGAATGCCCGTCCCTCCGTCTGA

AACCATCATCTTCTAGCCCTGGGCTCCCATCTATGCAGGCATCTCTCTGAGCCTCCGTTT
3901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3960
TTGGTAGTAGAAGATCGGGACCCGAGGGTAGATACGTCCGTAGAGAGACTCGGAGGCAAG

CTCCTGGAATTGGNTCAGAGCAATCCCGCTTGGTTACCAACCTCCAAACAGCTTCCCTTA
3961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4020
GAGGACCTTAACCNAGTCTCGTTAGGGCGAACCAAGTGGTTGGAGGTTTGTGGAAGGAAT

AGGACCTGTTTTCTCAAAANGGNAAGGTNCGGGCCTCCGGTCTTCAATANGTTTTCTTAA
4021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4080
TCCTGGACCAAAAGAGTTTTTNCNTTCCANGCCCGGAGGCCAGAAGTTATNCAAAAGGATT

AAAGGGANGAATGAAAANCCTTAAGNCCAAACAGGGGAACCCCTTGGNCCCCAAAGGGGA
4081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4140
TTTCCCTNCTTACTTTTNGGAATTCNNGTGTTCCTTGGGAACCGGGTTTTTCCCTT

CCTGGGTGGTTTCCCNNTTGGGGCCAAANTTATCCCAAAGGGTCCAATTGAAGGGTTAAC
4141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4200
GGACCCACCAAAAGGGNAACCCCGSTTTNAATAGGGTTTCCCCAGGTTAACTTCCCAATTG

CCCCCAAAAANNACCCNTTTCCCGCGGAATTTCCAAAGGTTTNCCTCCCCCGGCAAAANC
4201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4260
GGGGSTTTTTNTGSGNAAGGGGSCCTTAAAGSTTTCCAAANGGGGGGGGCGCTTTTNG

```

Figure 2-5

9 / 12

```
TCCCTTGGGGNCCNAANCCNTGGCCCGGNCCTGGCTTTCCCCCTTCCCAAGNATTC
4261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4320
AGGGAACCCCHNGGNTTNGGNACCGGGCCNGAACCGAAAAGGGGAAAGGGTTCNTAAAG

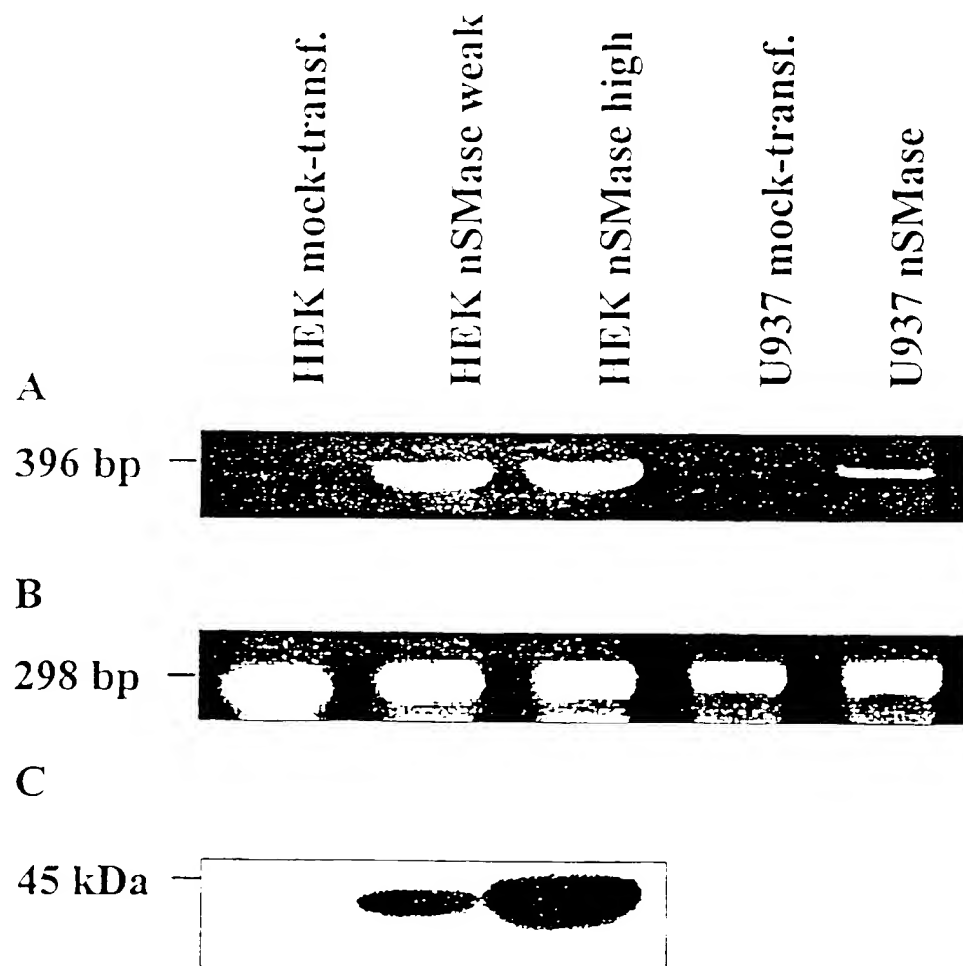
AAANNTTCCCTTGGGAAANCCCTTGNTTGGNAAAACCAATNANGAACCAANGCCAANNNT
4321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4380
TTTNNAAGGGANCCTTTNGGGGAACNAACCNTTTTGGNTTANTNCTTGGTNCGGTTNNA

TGCCAANAAACCNTTTGGGCAAAGGGGGNAAATTCANCAANGGGGNAATTGGGGAAACCC
4381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4440
ACGGTTNTTTGGNAAACCCGTTTCCCCNTTTAAGTNGTTNCCCCNTTAACCCCTTTGGG

NTGGGTTTNCCTTAAAGGGCCCAANANT
4441 -----+-----+-----+-----+-----+ 4468
NACCCAAANGGGTTTCCCGGGTTTNTNA
```

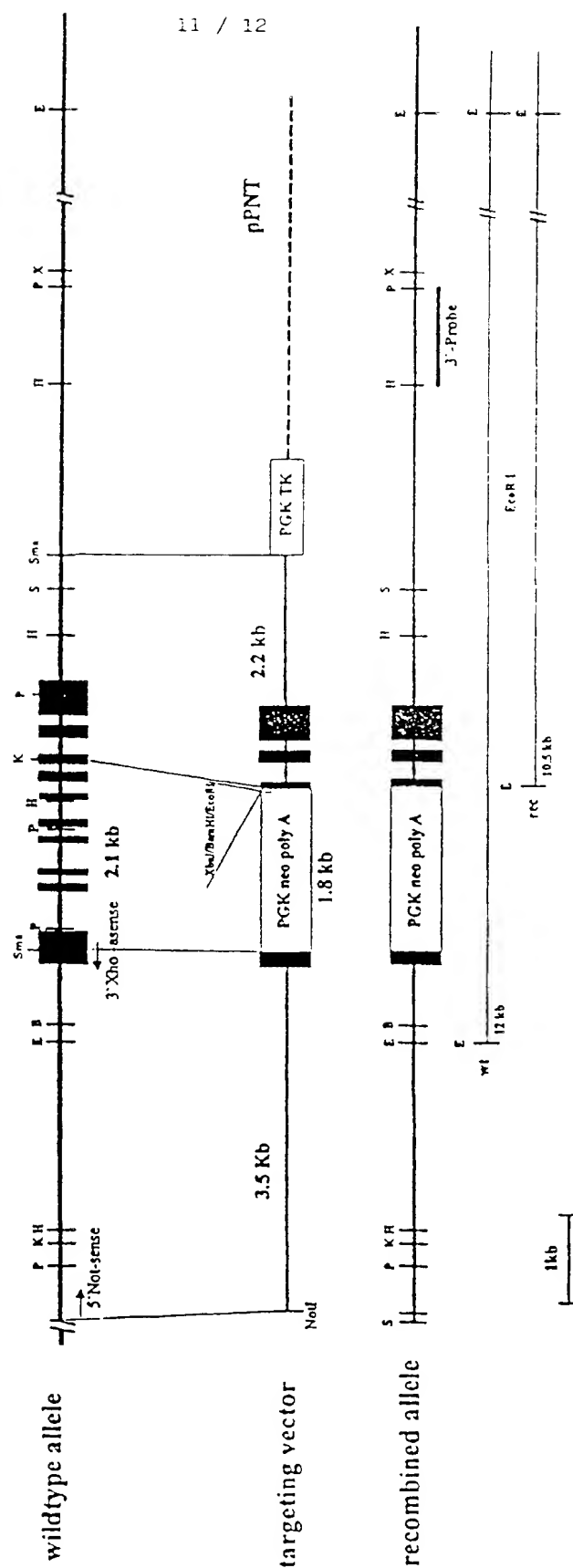
Figur 2-6

10/12



Figur 3

mnSMase "konventional" Knock Out



Figur 4

Konstrukte zur Generierung transgener Mausmutanten

Ubiquitinpromotor	nSMase	IRES	lacZ	polyA

polyA	rtTA	CMV	CMV-1	nSMase	IRES	GFP	polyA

Ubiquitinpromotor: Regulationssequenz des Ubiquitin-Gens, das eine ubiquitäre Transkription steuert.

nSMase: neutrale Sphingomyelinase

lacZ: lacZ, Gen kodiert für die β -Galaktosidase

polyA: Erkennungssignal für die Termination der Transkription und Polyadenylierung

CMV: Cytomegalovirus-Promotor des Cytomegalovirus-Gens, das eine ubiquitäre Transkription steuert.

rtTA: reverser Transaktivator, bindet an den Minimalpromotor und steuert dadurch die Transkription. Die Bindungseigenschaften des Transaktivators werden durch Tetrazyklin beeinflusst. Zugabe von Tetrazyklin läßt den Transaktivator an den Minimalpromotor binden und startet die Transkription, Wegnahme von Tetrazyklin verhindert die Bindung des Transaktivators an den Minimalpromotor und verhindert die Transkription.

CMV-1: Minimalpromotor, Bindung des Transaktivators startet die Transkription.

IRES: internal ribosomal entry sequence, virales Initiationssignal für die Translation.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Memorec Stoffel GmbH
- (B) STRASSE: Stoeckheimer Weg 1
- (C) ORT: Koeln
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 50829

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neutrale Sphingomyelinase

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 423 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Met Lys Leu Asn Phe Ser Leu Arg Leu Arg Ile Phe Asn Leu Asn Cys
1 5 10 15

Trp Gly Ile Pro Tyr Leu Ser Lys His Arg Ala Asp Arg Met Arg Arg
 20 25 30

Leu Gly Asp Phe Leu Asn Gln Glu Ser Phe Asp Leu Ala Leu Leu Glu
 35 40 45

Glu Val Trp Ser Glu Gln Asp Phe Gln Tyr Leu Arg Gln Lys Leu Ser
 50 55 60

Pro Thr Tyr Pro Ala Ala His His Phe Arg Ser Gly Ile Ile Gly Ser
65 70 75 80

Gly Leu Cys Val Phe Ser Lys His Pro Ile Gln Glu Leu Thr Gln His
85 90 95

Ile Tyr Thr Leu Asn Gly Tyr Pro Tyr Met Ile His His Gly Asp Trp
100 105 110

Phe Ser Gly Lys Ala Val Gly Leu Leu Val Leu His Leu Ser Gly Met
115 120 125

Val Leu Asn Ala Tyr Val Thr His Leu His Ala Glu Tyr Asn Arg Gln
130 135 140

Lys Asp Ile Tyr Leu Ala His Arg Val Ala Gln Ala Trp Glu Leu Ala
145 150 155 160

Gln Phe Ile His His Thr Ser Lys Lys Ala Asp Val Val Leu Leu Cys
165 170 175

Gly Asp Leu Asn Met His Pro Glu Asp Leu Gly Cys Cys Leu Leu Lys
180 185 190

Glu Trp Thr Gly Leu His Asp Ala Tyr Leu Glu Thr Arg Asp Phe Lys
195 200 205

Gly Ser Glu Glu Gly Asn Thr Met Val Pro Lys Asn Cys Tyr Val Ser
210 215 220

Gln Gln Glu Leu Lys Pro Phe Pro Phe Gly Val Arg Ile Asp Tyr Val
225 230 235 240

Leu Tyr Lys Ala Val Ser Gly Phe Tyr Ile Ser Cys Lys Ser Phe Glu
245 250 255

Thr Thr Thr Gly Phe Asp Pro His Ser Gly Thr Pro Leu Ser Asp His
260 265 270

Glu Ala Leu Met Ala Thr Leu Phe Val Arg His Ser Pro Pro Gln Gln
275 280 285

Asn Pro Ser Ser Thr His Gly Pro Ala Glu Arg Ser Pro Leu Met Cys
290 295 300

Val Leu Lys Glu Ala Trp Thr Glu Leu Gly Leu Gly Met Ala Gln Ala
 305 310 315 320
 Arg Trp Trp Ala Thr Phe Ala Ser Tyr Val Ile Gly Leu Gly Leu Leu
 325 330 335
 Leu Leu Ala Leu Leu Cys Val Leu Ala Ala Gly Gly Gly Ala Gly Glu
 340 345 350
 Ala Ala Ile Leu Leu Trp Thr Pro Ser Val Gly Leu Val Leu Trp Ala
 355 360 365
 Gly Ala Phe Tyr Leu Phe His Val Gln Glu Val Asn Gly Leu Tyr Arg
 370 375 380
 Ala Gln Ala Glu Leu Gln His Val Leu Gly Arg Ala Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Asp Leu Gly Pro Glu Pro Gln Pro Ala Leu Leu Leu Gly Gln Gln Glu
 405 410 415
 Gly Asp Arg Thr Lys Glu Gln
 420

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 419 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Leu Asn Phe Ser Leu Arg Leu Arg Val Phe Asn Leu Asn Cys
 1 5 10 15
 Trp Asp Ile Pro Tyr Leu Ser Lys His Arg Ala Asp Arg Met Lys Arg
 20 25 30
 Leu Gly Asp Phe Leu Asn Leu Glu Asn Phe Asp Leu Ala Leu Leu Glu
 35 40 45

Glu Val Trp Ser Glu Gln Asp Phe Gln Tyr Leu Arg Gln Arg Leu Ser
50 55 60

Leu Thr Tyr Pro Asp Ala His Tyr Phe Arg Ser Gly Met Ile Gly Ser
65 70 75 80

Gly Leu Cys Val Phe Ser Lys His Pro Ile Gln Glu Ile Phe Gln His
85 90 95

Val Tyr Ser Leu Asn Gly Tyr Pro Tyr Met Phe His His Gly Asp Trp
100 105 110

Phe Cys Gly Lys Ser Val Gly Leu Leu Val Leu Arg Leu Ser Gly Leu
115 120 125

Val Leu Asn Ala Tyr Val Thr His Leu His Ala Glu Tyr Ser Arg Gln
130 135 140

Lys Asp Ile Tyr Phe Ala His Arg Val Ala Gln Ala Trp Glu Leu Ala
145 150 155 160

Gln Phe Ile His His Thr Ser Lys Asn Ala Asp Val Val Leu Leu Cys
165 170 175

Gly Asp Leu Asn Met His Pro Lys Asp Leu Gly Cys Cys Leu Leu Lys
180 185 190

Glu Trp Thr Gly Leu His Asp Ala Phe Val Glu Thr Glu Asp Phe Lys
195 200 205

Gly Ser Asp Asp Gly Cys Thr Met Val Pro Lys Asn Cys Tyr Val Ser
210 215 220

Gln Gln Asp Leu Gly Pro Phe Pro Ser Gly Ile Arg Ile Asp Tyr Val
225 230 235 240

Leu Tyr Lys Ala Val Ser Glu Phe His Val Cys Cys Glu Thr Leu Lys
245 250 255

Thr Thr Thr Gly Cys Asp Pro His Ser Asp Lys Pro Phe Ser Asp His
260 265 270

Glu Ala Leu Met Ala Thr Leu Tyr Val Lys His Ser Pro Pro Gln Glu
275 280 285

Asp Pro Cys Thr Ala Cys Gly Pro Leu Glu Arg Ser Asp Leu Ile Ser
 290 295 300
 Val Leu Arg Glu Ala Arg Thr Glu Leu Gly Leu Gly Ile Ala Lys Ala
 305 310 315 320
 Arg Trp Trp Ala Ala Phe Ser Gly Tyr Val Ile Val Trp Gly Leu Ser
 325 330 335
 Leu Leu Val Leu Leu Cys Val Leu Ala Ala Gly Glu Glu Ala Arg Glu
 340 345 350
 Val Ala Ile Ile Leu Cys Ile Pro Ser Val Gly Leu Val Leu Val Ala
 355 360 365
 Gly Ala Val Tyr Leu Phe His Lys Gln Glu Ala Lys Gly Leu Cys Arg
 370 375 380
 Ala Gln Ala Glu Met Leu His Val Leu Thr Arg Glu Thr Glu Thr Gln
 385 390 395 400
 Asp Arg Gly Ser Glu Pro His Leu Ala Tyr Cys Leu Gln Gln Glu Gly
 405 410 415
 Asp Arg Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1662 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GCGGCCGCGA CCGCCGGGGA CGAGCTTGGA GGAAAAGGAA CCGGGAGCCG CCCACCCGGG 60
 GGCGCTCTCC GGACCCCCAG GGTCTAGCG CGCGGCCCTT ACCGAGCCTG GGCGCCCGGA 120
 TTTCGGSAGC GGATCGCCTT TCCGGGTTGG CGGCCCGCCT GATTGGGAAC AGCCGGCCGG 180

TTGCCGGGGG AACGCGGGAG TCGGGGCCGA CCTGAGCCAC GCGGGCTTGS TSCCCACCTG 240
TGC GCGCGGC CTGCGAAGAA GGAACGGTCT AGGGAGAAGG CGCCGCCGGC CGCCCCCGTC 300
CCCACCGCGG CCGTCGCTGG AGAGTTGAG CCGCCTAGCG CCCCTGAGC TCCCCAACCA 360
TGAAGCTCAA CTTCTCCCTG CGACTGCGGA TCTTCAACCT CAACTGCTGG GGCATTCCGT 420
ACTTGAGCAA GCACCGGGCC GACCGCATGA GCGCCTGGG AGACTTTCTG AACCAGGAGA 480
GCTTCGACCT GCCTTTGCTG GAGGAGGTGT GGASTGAGCA GGAATTCCAG TACCTGAGAC 540
AGAAGCTGTC ACCTACCTAC CCAGCTGCAC ACCACTTCCG GAGCGGAATC ATTGGCAGTG 600
GCCTCTGTGT CTTCTCCAAA CATCCATCC AGGAGCTTAC CCAGCACATC TACACTCTCA 660
ATGGCTACCC CTACATGATC CATCATGGTG ACTGTTTCAG TGGGAAGGCT GTGGGGCTGC 720
TGGTGCTCCA TCTAAGTGGC ATGGTGCTCA ACGCCTATGT GACCCATCTC CATGCCGAAT 780
ACAATCGACA GAAGGACATC TACCTAGCAC ATCGTGTTGG CCAAGCTTGG GAATTGGCCC 840
AGTTCATCCA CCACACATCC AAGAAGGCAG ACGTGTTCT GTTGTGTGGA GACCTCAACA 900
TGCACCCAGA AGACCTGGGC TGCTGCCTGC TGAAGGAGTG GACAGGGCTT CATGATGCCT 960
ATCTTGAAAC TCGGGACTTC AAGGGCTCTG AGGAAGGCAA CACAATGGTA CCCAAGAACT 1020
GCTACGTCAG CCAGCAGGAG CTGAAGCCAT TTCCCTTTGG TGTCCGCATT GACTACGTGC 1080
TTTACAAGGC AGTTTCTGGG TTTTACATCT CCTGTAAGAG TTTTGAAACC ACTACAGGCT 1140
TTGACCCTCA CAGTGGCACC CCCCTCTCTG ATCATGAAGC CCTGATGGCT ACTCTGTTTG 1200
TGAGGCACAG CCCCCACAG CAGAACCCCA GCTCTACCCA CGGACCAGCA GAGAGGTCGC 1260
CGTTGATGTG TGTGCTAAAG GAGGCCTGGA CGGAGCTGGG TCTGGGCATG GCTCAGGCTC 1320
GCTGGTGGGC CACCTTCGCT AGCTATGTGA TTGGCCTGGG GCTGCTTCTC CTGGCACTGC 1380
TGTGTGCTCT GCGGCTGGA GGAGGGGCGG GGGAGCTGC CATACTGCTC TGGACCCCA 1440
GTGTAGGGCT GGTGCTGTGG GCAGGTGCAT TCTACCTCTT CCACGTACAG GAGGTCAATG 1500

GCTTATATAG GGCCCAGGCT GAGCTCCAGC ATGTGCTAGG AAGGGCAAGG GAGGCCCAGG 1560
ATCTGGGCCC AGAGCCTCAG CCAGCCCTAC TCCTGGGGCA GCAGGAGGGG GACAGAACTA 1620
AAGAACAATA AAGCTTGGCC CTTTAAAAAA ·AAAAAAAAAA AA 1662

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1627 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GTGCTGGTGG AAGCCGAGCC GGAACAAGG GAGGAACCTG TAGGCCGCGG TGCGAGAACC 60
CACCGAAGAC CTAAGAATCT GGAACAGTCC ACCCGAGATT CCTTCCAGGA CTGCCGGCGG 120
CTCGCGCACC AGCCCGGGAT TTGCAGCCGA CCTTCTTTCC GGGTGGAAGG ACGGCCTTTG 180
TCCCAGTAAC GCAGGAGTCG CCCCCACCC CCAACCAGCT CGCGTTCCTG GGTCCGGGCA 240
GCGCAGGACA GGGCAATAAG CCTGTGCGCG CAATCCGCCT CGCCGCCCTT GCTCCGAAGC 300
ACTCCAGCCA TGAAGCTCAA CTTTTCTCTA CGGCTGAGAG TTTTCAATCT CAACTGCTGG 360
GACATCCCCT ACCTGAGCAA ACATAGGGCG GACCGCATGA AGCGTTGGG AGACTTTCTG 420
AACTTGGAAG ACTTTGATCT GGCTCTCCTG GAGGAGGTGT GGAGTGAGCA GGAATTCCAG 480
TACCTAAGGC AAAGGCTATC GCTCACCTAT CCAGATGCAC ACTACTTCAG AAGCGGGATG 540
ATAGGCAGTG GCCTCTGTGT GTTCTCCAAA CACCCAATCC AGGAAATCTT CCAGCATGTC 600
TACAGTCTGA ATGGTTACCC CTACATGTTT CATCATGGAG ACTGGTTCTG TGGGAAGTCT 660
GTGGGGCTGC TGGTGCTCCG TCTAAGTGGA CTGGTGCTCA ATGCCTACGT GACTCATCTA 720
CATGCTGAGT ACAGCCGACA GAAGGACATC TACTTTGCAC ACCGTGTGGC CCAAGCTTGG 780

GAAGTGGCCC AGTTCATCCA CCACACATCC AAGAATGCAG ATGTGGTTCT ATTGTGTGGA	840
GACCTCAATA TGCACCCCAA AGACCTGGGC TGCTGCCTGC TGAAGAGTG GACAGGGCTC	900
CATGATGCTT TCGTTGAGAC TGAGGACTTT AAGGGCTCTG ATGATGGCTG TACCATGGTA	960
CCCAAGAACT GCTACGTCAG CCAGCAGGAC CTGGGACCGT TTTCGTCTGG TATCCGGATT	1020
GATTACGTGC TTTACAAGGC AGTCTCTGAG TTCCACGTCT GCTGTGAGAC TCTGAAAACC	1080
ACTACAGGCT GTGACCCTCA CAGTGACAAG CCCTTCTCTG ATCACGAGGC CCTCATGGCT	1140
ACTTTGTATG TGAAGCACAG CCCCCCTCAG GAAGACCCCT GTACTGCCTG TGGCCCACTG	1200
GAAAGSTCCG ATTTGATCAG CBTGCTAAGG GAGGCCAGGA CAGAGCTGGG GCTAGGCATA	1260
GCTAAGCTC GCTGGTGSGC TBCATTCTCT GGCTATGTGA TCGTTTGGGG GCTGTCCCTT	1320
CTGGTGTTCG TGTGTGTCCT G3CTGCAGGA GAAGAGGCCA G3GAAGTGGC CATCATCCTC	1380
TGCATACCCA GTGTGGGTCT GGTGCTGGTA GCAGGTGCAG TCTACCTCTT CCACAAGCAG	1440
GAGGCCAAGG GCTTATGTCG GGCCCAGGCT GAGATGCTGC ACGTTCTGAC AAGGGAAACG	1500
GAGACCCAGG ACCGAGGCTC AGAGCCTCAC CTAGCCTACT GCTTGCAGCA GGAGGGGGAC	1560
AGAGCTTAAG AGCTTAACAA TAAACTTGC TTGACACACA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1620
AAAAAAA	1627

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 4464 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GACTCGATCC CCGCGAACGC TCGCTCGCGC TCCGAGTCTC TTCCAGGTCT CCCTTCCTTG	60
---	----

CGACCAGCAT TTGTTCTCTA TGCCCCCATC CAGCCCTAGG ACAGAACGTG GACCCCCGCC	120
CGCCAGCGCA GGCGACACCG CGGCAGGGGG CTGAGGTGCG CACGGCGTCT GGGGCGAGGG	180
GTTACCTCAG CGATGGTCTT TGACACCTGA AAGCTGGAGC TTTTGAAGAG CCCACCACC	240
TTCAGCTTCA GGGGCGGCTC GGGCGGCAAC CGCACGTGAC ATGCTGGGGG CTTCGACTTG	300
GGCCGGCAG GCTGCTGGGT GGCCATGGCA GGGACAGCAG AGAGCCCGGA ACACAAATAG	360
TGCGAGTCGC CAGGGCAACC GCGTGGCTCC TCCCCGAACG CCCGCAAGGG GCGGGACCTG	420
AGTGAGTTCG TGGGCGGGGC CTCGCATCAA CTTCAAGCCT GTTGCTGGTG GAAGCCGAGC	480
CGGGAACAAG GGAGGAACCT GTAGGCCGCG GTGCGGATAA CCCACCGAAG GACCTAAGAA	540
TCTGGAACAG TCCACCCGAG ATTCTTCCA GGAAGTCCGG CGGACTCTCG CATTAGCCC	600
GGGATTTGCA GCCGACCTTC TTTCCGGGTG GAATGACGGC CTTTGTCCCA GTAACGCAGG	660
AGTAGCCCCC CACCCCCAAC CAGCTCGCGT TCCTGGGTCTG GGGCAGCGCA GGATAGGGCA	720
ATAAGCCTGT GCGCGCAATC CGCCTCGCCG CCCTTGCTCC GAAGCACTCC AGCCATGAAG	780
CTCAACTTTT CTCTACGGCT GAGAGTTTTT AATCTCAACT GCTGGTAAGT AAGTGCTCCC	840
AGGCGTGGGC TGCAGCCTCG GAGCCACCTT CCAGTCCCCT CTCGCACATG CCTAGGAAGG	900
AAGCAGGTCT TCTTCAGCCG AGCTAGACCC TGTCCTTCCC GAACCACCAA AGTCCACATC	960
GCCTAAAGAC CAGAGCTTGG GTGGTTGCAG CAATCACCAA AGTCCCTATC ATCCAAAGCT	1020
GAGGTGATGA CAGCAGTAAT CGTCCCAAAC CTGGCCCATG TCTTTCCTTT TAAATGATTT	1080
ACTTTTATTT TATGTACATT TGGTGTTTTG CCTGTATGTA TGTCTGTGTG AAGGTGCCAG	1140
ATTCTCTGGA ACTGGAGTTA CAGACAGTTG TAAGCTGTCA TGTGCTTGCT GGAAATTGAA	1200
CTGCTGACCC ATCTCTTCTG CCCCCTGCGT CCTCCACCCC TTTTAGGGAC ATCCCCTACC	1260
TGAGCAAACA TAGGGCGGAC CGCATGAAGC GCTTGGGAGA CTTTCTGAAC TTGGAAAAC	1320
TTGATCTGGC TCTCCTGGAG GAGGTGAGGT TGTAGGGCAG GCTAGGTTGG AGGAGGGCAG	1380

CAGGCGGCAG GCGGCGGCAG GAAACTTGT TCTGTCTTGG GATGAAATCC CAAGCAAGTA 1440
TCCTCACCTT CTTCCCTCCAG GTGTGGAGTG AGCAGGACTT CCAGTACCTA AGGCAAAGGC 1500
TATCGCTCAC CTATCCAGAT GCACACTACT TCAGAAGGTG AAAAGCCTGT GTTCTCAGCC 1560
TGTTCTCAGA CGAGGAAGCT CTCCAACATT CTTGCTTGCA CCCTCGATCT TCTTCCTCTG 1620
GGTGTGAGAA GAGCAGGCCG TCACCCTCAT CTTGCAAGGG CTGCTGTCTT AGGCTTTGTT 1680
CTGGGGTTGA TCTTAGCAGT AGAGCTGGGA GACCGCGGAG GGAAGAGGG CTGGCTGGGT 1740
ACTCCCCCTC TTGCTCTTCT GGTATTAAAG CAAGAGTTGG TTTTCAGCGG GATGATAGGC 1800
AGTGGCCTCT GTGTGTTCT CAAACACCCA ATCCAGGAAA TCTTCAGCA TGTCTACAGT 1860
CTGAATGGTT ACCCCTACAT GSTAAGGATC TCTTCCTAT CCTTGCTAAC ACAGACTGGA 1920
CGCAGCCTTC CTGGGGCCTT GGCAGGAGGG TGTCAGTACC CTGAGTTTTT GTCTTCTCTT 1980
GCCTGCAGTT CCATCATGGA GACTGGTTCT GTGGGAAGTC TGTGGGGCTG CTGGTGCTCC 2040
GTCTAAGTGG ACTGGTGCTC AATGCCTACG TGAATCATGT GAGTGGGGCT AGCCAGGCTT 2100
AGGCAGTGGG TCAAGCAGCC CAATGCTATG GTGGAGAAGA GACGCCACTA GTTAGTTCTG 2160
CTGCCTGGGG ATAAGGCATG GGATCAGAAG CTAGCATTGG GCAAGGTTCA CCCATTCCCT 2220
GTCACACTCT GCCATGTGAC AGATGACAAG CTTGATTGAG ACAGCCTTCT CTTTGATTTC 2280
ACCTATTCCA CTTTAGCTAC ATGCTGAGTA CAGCCGACAG AAGGACATCT ACTTTGCACA 2340
CCGTGTGGCC CAAGCTTGGG AACTGGCCCA GTTCATCCAG TGTGTGAGCC TGGGCTTGAT 2400
GGGGGCTGTG GGGTGGGGAC GGGGTTGAGG GATGNGNAAN TTATCCTTGA AGAGGGCACA 2460
TAATAAGGSA AGAATTTCTT CCTTGCCGCT CTTCCCCCAA CTCAGCCACA CATCCAAGAA 2520
TGCAGATGIG GTTCTATTGT GTGGAGACCT CAATATGCAC CCCAAAGACC TGGGCTGCTG 2580
CCTGCTGAAA GAGTGGACAG GGCTCCATGA TGCTTTCGTT GAGACTGAGG ACTTTAAGGT 2640
GAGAGACTGT TTCCACCAA CTCCACACTT GTTCCAGTCT TCCTGTCTCT TAGCATCCTA 2700

GCCACCTGTT TCCCTAGGGC TCTGATGATG GCTGTACCAT GGTACCCAAG AACTGCTACG 2760
TCAGCCAGCA GGACCTGGGA CCGTTTCCGT CTGGTATCCG GATTGATTAC GTGCTTTACA 2820
AGGTCAGGCT CTTATTCCCG GTGTGCCTTC TCCAGTATCT TCCTTCCTCT GTCACTAGCC 2880
CACGCTTTAG TTCAGCTACA GTCTTGGGCC ACTGATGGCT AAAGAATAGA ATCCTGTCGG 2940
CTGGTTCTCT GGGAGAATTT AAGCTTCTCC ATGTTCTTGC TCTTCCTAGG CAGTCTCTGA 3000
GTTCCACGTC TGCTGTGAGA CTCTGAAAAC CACTACAGGC TGTGACCCTC ACAGTGACAA 3060
GCCCTTCTCT GATCACGAGG CCTCATGGC TACTTTGTAT GTGAAGCACA GCCCCCTCA 3120
GGAAGACCCC TGTACTGCCT GTGGTAAGCA GCATTTCTTT TGCCCCCTCT ACTTTAAGGC 3180
AGCCCCGCCT CCATCCTGAC CCTCCCCTGC TCTACGTTCT CTCTTTTCC AGGCCCCACTG 3240
GAAAGGTCCG ATTTGATCAG CGTGCTAAGG GAGGCCAGGA CAGAGCTGGG GCTAGGCATA 3300
GCTAAAGCTC GCTGGTGGGC TGCATTCTCT GGCTATGTGA TCGTTTGGGG GCTGTCCCTT 3360
CTGGTGTTGC TGTGTGTCCT GGCTGCAGGA GAAGAGGCCA GGGAAGTGGC CATCATCCTC 3420
TGCATACCCA GTGTGGGTCT GGTGCTGGTA GCAGGTGCAG TCTACCTCTT CCACAAGCAG 3480
GAGGCCAAGG GCTTATGTCG GGCCCAGGCT GAGATGCTGC ACGTTCTGAC AAGGGAAACG 3540
GAGACCCAGG ACCGAGGCTC AGAGCCTCAC CTAGCCTACT GCTTGCAGCA GGAGGGGGAC 3600
AGAGCTTAAG AGCTTAACAA TAAAACTTGC TTGACACACT CTAGTGGCTC TACCTTGTTT 3660
CTTGCAGAGG CATGATGGGA ACTGAAGGTC AGTGGCCTTG TCACTGTGTG GCTTTAGAGC 3720
GTTGGCCTCT CACTTGCCTT TTTTGCACAC TCCCGTCTCC TGCCAGCACA GAGCATAAAC 3780
CCTGTTTATG GTCATAATCC TTTTATTGTA AACAAACGAAG CCTCTGACTA AGCAGTCCAG 3840
ATGGCGGAGG TACAGCCCTT GTGATGGTGT CTTGCTTACG GGGCAGGGAG GCAGCTAACC 3900
ATCATCTTCT AGCCCTGGGC TCCATCTAT GCAGGCATCT CTCTGAGCCT CCGTTCCTCC 3960
TGGAATTGGN TCAGAGCAAT CCCGCTTGGT TCACCAACCT CCAAACAGCT TCCTTAAGGA 4020

CCTGGTTTCT CAAAANGGNA AGSTNCGGGC CTCGGGTCTT CAATANGTTT TCCTAAAAAG	4080
GGANGAATGA AAANCCTTAA GGNCCAACAA GGGGAACCCT TGGNCCCAA AGGGGACCTG	4140
GGTGGTTTCC CNTTGGGGCC AAANTTATCC CAAAGGGGTC CAATTGAAGG GTTAACCCCC	4200
CAAAAANNAC CTTTTCCCC CGGAATTTCC AAAGGTTTNC CCCCCCGGC AAAANCTCCC	4260
TTGGGGNNCC NAANCNTGG CCGGNCCTTG GTTTTCCCC CTTTCCCAAG NATTTCAAAN	4320
NTTCCCTNGG AAANCCCTT GNTTGGNAAA ACCNAATNAN GAACCANGCC AANRNTTGCC	4380
AAANAACCN TTTGGGCAAAG GGGGNAAATT CANCAANGG GNAATTGGGG AAACCCNTGG	4440
GTITNCCCAA AGGGCCCNAA NANT	4464

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2852 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

ACCGCGGCCG TCGCTGGAGA GTTCGAGCCG CCTAGCGCCC CTGGAGCTCC CCAACCATGA	60
AGCCCAACTT CTCCCTGCGA CTGCGGATCT TCAACCTCAA CTGCTGGTGA GTGCGTCTGC	120
GGAGTGC GGT CTGGGGGCCA CCTCCGTTT GCACCCATGC AGCCTTCCTC CCCCTATCCC	180
GCCCCACGAT CTCAGGGTGT AGGGAAAACC CGAACCTCCA AAGTCCACAT CTGGCCCCAG	240
CGCCGGTGGT CCCAGCAGTC GCCTCCCCTG CCCCCTCTTT CCCTTCCTTA GGGGCATTCC	300
GTACTTGAGC AAGCACC GGG CCGACCGCAT GAGGCGCCTG GGAGACTTTC TGAACCAGGA	360
GAGCTTCGAC CTGGCTTTGC TGGAGGAGGT GAGATTGTGC AGCACGGTGC GGAACCCAGG	420
CTGGGAGGAG GGACAGACCG TCCCACTGGG GAAAGACCAA GCAGGCATCC TCACCGCTTC	480

CCTCAGGTGT GGAGTGAGCA GGA CTTCAG TACCTGAGAC AGAAGCTGTC ACCTACCTAC 540

CCAGCTGCAC ACCACTTCCG GAGGTGAGAA GCCCACTGGC CTGAAGCCTG TTGTCATCCC 600

AGGAGGCTCT TGGCCCTGCC AGCCCTTCCC TATCCTGCCT GCACTCTCCA GTCTCCTCCA 660

GCCTCCTCTC CCTCTGGATG TGAGAGAAGG AGAAGGGTGA ACCAAGAAGG TCCTATGACT 720

TCAGCCCATC TCAGCTTTGT TTTCTGGCTG CCCTATACTC CTCCAAAGGC CGTCGCCTTG 780

GTTCTAGGGC TAGTCCCAGC AGTAGAAAAA GAAAAAATA GCTGATCAGA GCTGGAAGAC 840

AAGGGAGGGG AAGAAGGCTG GGTGTCTCTC CCTGTTTTTC TGGTTATTAA GCAGGGCTTG 900

GCTTTCAGCG GAATCATTGG CAGTGGCCTC TGIGTCTTCT CCAAACATCC AATCCAGGAG 960

CTTACCCAGC ACATCTACAC TCTCAATGGC TACCCCTACA TGSTAAGGCA GACCTTTGAC 1020

CTCTTCCACC TCCCTTCCCC ACCTCCAGTA ATACAAGGTA GAGGAGGCAG CCCTCTGAGA 1080

GCTGCAGGGG ATGGGCAGAA AGATGGTGGC GGTGCCCTGA GTTCTCTATCT CCTCCTGCCT 1140

GCAGATCCAT CATGGTGA CTGTTCACTGG GAAGGCTGTG GGGCTGCTGG TGCTCCATCT 1200

AAGTGGCATG GTGCTCAACG CCTATGTGAC CCATGTGAGT GAAGCTGGCA GTGCCTAGGG 1260

CTGGGACATG CAGCCAGTC CTGGGACAGA GAGATGGTAC TTCTCTAGCT CTCATACCTG 1320

GGGATGAGGT GTGGGGGCAA GATCTTATAA GGAAGCAATG GGCAAGGCTT ATCCATTGTA 1380

TACCAAACAC CATGCCAAGT GACAGACACA GGCTTGATTG AGACATACCC CTGGGACCCT 1440

CAGTCTTATC TGCTGTGATC TCATCCATCT TGCTCAGCTC CATGCCGAAT ACAATCGACA 1500

GAAGGACATC TACCTAGCAC ATCGTGTGGC CCAAGCTTGG GAATTGGCCC AGTTCATCCA 1560

GTGTGTGAGC CTGGGCTTGA AATGGGAAGT GGGATGGGAC CCAGGGGCTG AGGGTGAACA 1620

AGGCCCCAGT CATGGGGAAG AGCTGGTGAT GGAAGAACTC CCGCCTCACC AACCTGGTTC 1680

CCCCAGCCAC ACATCCAAGA AGGCAGACGT GGTTCTGTTG TGTGGAGACC TCAACATGCA 1740

CCCAGAAGAC TGGGCTGCTG CCTGCTGAAG GAGTGGACAG GGCTTCATGA TGCCTATCTT 1800

GAAACTCGGG ACTTCAAGST GAGGACTTGC CTGTTACTTC CCCACCTATA TCCCCAGCTT	1860
CTCTCCCTCC TTCTCCCCCA CATCCTAGCA TGAGCCAATG ATTCCCTTAG GGCTCTGAGG	1920
AAGGCAACAC AATGGTACCC AAGAACTGNT ACGTCAGCCA GCAGGAGCTG AAGCCATTTT	1980
CCTTTGSGTGT CCGCATTGAC TACGTGCTTT ACAAGGTCAG GCTCCTCCCT TCAACATGCT	2040
TTCATATGCT GTGTCTCTTT GTCTACTAAC CTGTGTAGAT CCTTTGCTCA GNTAGTCTAG	2100
TCTTGACCA CTGATGGGTG GAAAGTGGG TAGCCGGGAG CTGGTTCTCT GGAAGAGGC	2160
CCTCATATAT AAGCTTCTCT NTGGCCCTTA CTTTTCCTAG GCAGTTTCTG GGTTTTACAT	2220
CTCCTGTAAG AGTTTTGAAA CCACIACAGG CTTTGACCCT NACAGGGGCA CCCCCCTCTC	2280
TTGATCATGA AGCCCTGATG GCTACTCTGT TTGTGAGGCA CAGCCCCCA CAGCAGAACC	2340
CCAGCTCTAC CCACGGTGAG TCACCCCCAC CCTTTCCTTG GCCCTTGCCC CGCTTGAAGC	2400
AGCCCTTCCA CTCTTGACTC TCTCCTGCCC CACTGCCCTG CTCTGTTGTA GGACCAGCAG	2460
AGAGGTGCCC GTTGATGTGT GTGCTAAAGG AGGCCTGGAC GGAGCTGGGT CTGGGCATGG	2520
CTCAGGCTCG CTGGTGGGCC ACCTTCGCTA GCTATGTGAT TGGCCTGGGG CTGCTTCTCC	2580
TGGCACTGCT GTGTGTCCTG GCGGCTGGAG GAGGGGCCGG GGAAGCTGCC ATACTGCTCT	2640
GGACCCCCAG TGTAGGGCTG GTGCTGTGGG CAGGTGCATT CTACCTCTTC CACGTACAGG	2700
AGGTCAATGG CTTATATAGG GCCCAGGCTG AGCTCCAGCA TGTGCTAGGA AGGGCAAGGG	2760
AGGCCCAGGA TCTGGGCCCA GAGCCTCAGC CAGCCCTACT CCTGGGGCAG CAGGAGGGGG	2820
ACAGAACTAA AGAACAATAA AGCTTGGCCC AA	2852

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/05127

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/55 C12N9/16 C12N5/10 C07K16/40 G01N33/50
A61K38/43 A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K A01K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	CHATTERJEE S. & GHOSH N.: "Neutral sphingomyelinase from human urine" J. BIOL. CHEM., vol. 264, no. 21, 25 July 1989, pages 12554-12561, XP002087487 see the whole document	1-3,5-7, 9,21,24
A	---	4,8, 10-20, 22,23
P,X	WO 98 28445 A (CHATTERJEE SUBROTO ;UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 2 July 1998 see abstract see figures 1,2 see claims 1-30 ---	1-3,5-7, 9,14-19, 21,24
	--- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex

* Special categories of cited documents

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 December 1998

Date of mailing of the international search report

29/12/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Galli, I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Patent Application No.
PCT/EP 98/05127

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KOSTELLOW A ET AL: "REDUCTION IN EXTRACELLULAR MG2+ INDUCES SPHINGOMYELINASE. ELEVATES CERAMIDE AND RELEASES NF-KB IN AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS" FASEB JOURNAL, vol. 10, no. 6, 30 April 1996, page A1253 XP000644454 see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	3
A	<p>CAI Z. ET AL.: "Alteration of the sphingomyelin/ceramide pathway is associated with resistance of the human breast carcinoma MCF7 cells to Tumor Necrosis Factor alpha-mediated cytotoxicity." J. BIOL. CHEM., vol. 272, no. 11, 14 March 1997, XP002087488 see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	14-17
A	<p>DATABASE GENBANK Accession No. AA412649, 18 May 1997 HILLIER ET AL.: "H. sapiens cDNA clone IMAGE 730457 - EST." XP002087490 compare with amino acids 247-394 in sequence ID 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-24
P,X	<p>TOMIUK S. ET AL.: "Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling?" PRC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 95, no. 7, 31 March 1998, pages 3638-3643, XP002087489 see the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-11, 20-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/05127

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although the claim(s) 16 and 17 relate(s) to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

information on patent family members

PCT/EP 98/05127

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9828445 A	02-07-1998	AU 5809398 A	17-07-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05127

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/55 C12N9/16 C12N5/10 C07K16/40 G01N33/50
 A61K38/43 A01K67/027

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K A61K A01K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHATTERJEE S. & GHOSH N.: "Neutral sphingomyelinase from human urine" J. BIOL. CHEM., Bd. 264, Nr. 21, 25. Juli 1989, Seiten 12554-12561, XP002087487 siehe das ganze Dokument	1-3,5-7, 9,21,24
A	---	4,8, 10-20, 22,23
P,X	WO 98 28445 A (CHATTERJEE SUBROTO ; UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 2. Juli 1998 siehe Zusammenfassung siehe Abbildungen 1.2 siehe Ansprüche 1-30 ---	1-3,5-7, 9,14-19, 21,24
	--- -/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. Dezember 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29/12/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P. B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Galli, I

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05127

C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich, unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitrag, Anspruch Nr.
A	<p>KOSTELLOW A ET AL.: "REDUCTION IN EXTRACELLULAR MG2+ INDUCES SPHINGOMYELINASE. ELEVATES CERAMIDE AND RELEASES NF-KB IN AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS"</p> <p>FASEB JOURNAL.</p> <p>Bd. 10, Nr. 6, 30. April 1996, Seite A1253</p> <p>XP000644454</p> <p>siehe Zusammenfassung</p> <p>---</p>	3
A	<p>CAI Z. ET AL.: "Alteration of the sphingomyelin/ceramide pathway is associated with resistance of the human breast carcinoma MCF7 cells to Tumor Necrosis Factor alpha-mediated cytotoxicity."</p> <p>J. BIOL. CHEM.</p> <p>Bd. 272, Nr. 11, 14. März 1997.</p> <p>XP002087488</p> <p>siehe Zusammenfassung</p> <p>---</p>	14-17
A	<p>DATABASE GENBANK</p> <p>Accession No. AA412649, 18. Mai 1997</p> <p>HILLIER ET AL.: "H. sapiens cDNA clone IMAGE 730457 - EST."</p> <p>XP002087490</p> <p>Vergleiche mit Aminosäuren 247-394 in Seq. ID 1</p> <p>---</p>	1-24
P.X	<p>TOMIUK S. ET AL.: "Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling?"</p> <p>PROC. NATL. ACAD. SCI. USA.</p> <p>Bd. 95, Nr. 7, 31. März 1998, Seiten 3638-3643, XP002087489</p> <p>siehe das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-11, 20-24

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05127

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
 weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
 Bemerkung: Obwohl der(die) Anspruch(üche) 16 und 17
 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen
 Körpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich
 auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
 weil Sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
 daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Patentzeichen

PCT/EP 98/05127

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitgliedern der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9828445 A	02-07-1998	AU 5809398 A	17-07-1998

